บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สาหร่ายที่ใช้ในการวิจัย

1. *Chlorella* sp.
2. *Scenedesmus* sp.
3. *Ankistrodesmus* sp.

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ขวดรูปชมพู่ (Flask) 100 125 และ 1,000 ml
2. กระบอกตวง
3. บีกเกอร์
4. ปิเปต 1 และ 10 ml
5. Auto Pipette
6. ขวดเก็บตัวอย่าง Duran 1,000 ml
7. ขวดแก้วทึบแสง
8. แท่งแก้ว
9. หลอดแก้ว
10. หลอดทดลองขนาด 15 ml
11. Thermometer
12. กระดาษกรอง GF/C
13. สำลี กระดาษ Foil
14. ปากคีบ (Forceps)
15. ลูกยาง
16. Spectrophotometer GENESYS 20
17. สไลด์นับเซลล์สาหร่าย (Haemacytometer)
18. กล้องจุลทรรศน์ OLYEMPUS CH-30
19. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux Meter)
20. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

21. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

22. เครื่องปั่นละเอียด (Homogenizer)

23. เครื่องชั่งแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง AND Model hr-200

24. หม้อนึ่งความชื้น (Autoclave) *SANYO*

25. ตู้อบ RAVEN 2 OVEN

26. เครื่องเติมอากาศ (Air Pump)

27. ชุดกรองสุญญากาศ

28. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Mercury 1,000 µg/ ml (Hg Metal in 1.0 M HNO_3) จากบริษัท J. T. Baker

2. Cadmium 1,000 µg/ ml (Cd Metal in 0.3 M HNO_3) จากบริษัท J. T. Baker

3. Lead Nitrate (Pb Metal in 0.5% Nitric Acid) จากบริษัท APS Ajax Finechem

4. Arsenic (III) Oxide (AsO_3) 1,000 ppm จากบริษัท J. T. Baker

5. Copper 1,000 µg/ ml (Cu Metal in 0.3 M HNO_3) จากบริษัท J. T. Baker

6. 80% Acetone

7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 M

8. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) จากบริษัท VWR International

วิธีดำเนินการทดลอง

ในการศึกษาผลของโลหะหนักต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย นั้นเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการจากนั้นนำสาหร่ายมาทำการเลี้ยงในโลหะหนักที่กำหนด และวัดการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเซลล์ หาปริมาณน้ำหนักแห้ง และปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสาหร่าย เป็นต้นซึ่งสามารถแสดงเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. การเตรียมอาหาร (Media)

2. สภาวะที่ใช้ในการทดลอง (Conditions)

3. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Cultivation of The Algae)

4. การทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนัก (Toxicity Test)

5. การศึกษา Competition Growth

6. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Growth Measurements)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. วิธีการหาค่า EC_{50}

ซึ่งจะแสดงรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนข้างต้นดังต่อไปนี้

1. การเตรียมอาหาร (Media) (ภาคผนวก)

การเตรียมอาหารสูตร NS III เพื่อเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด คือ *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Ankistrodesmus* sp. เมื่อเตรียมเสร็จแล้วปรับให้ได้ pH 8 จึงนำอาหารไปอบฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สภาวะที่ใช้ในการทดลอง (Condition)

ทำการทดลองภายในอุณหภูมิห้อง (25±1 องศาเซลเซียส) ที่ระดับความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ และวัดอุณหภูมิตลอด 24 ชั่วโมง ณ ห้องปฏิบัติการของโครงการบัณฑิตศึกษา ชั้น 5 ห้อง 5204 (ดังภาพที่ 8)

ภาพที่ 8 ห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อทำเป็น Stock Solutions

3. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Cultivation of The Algae)

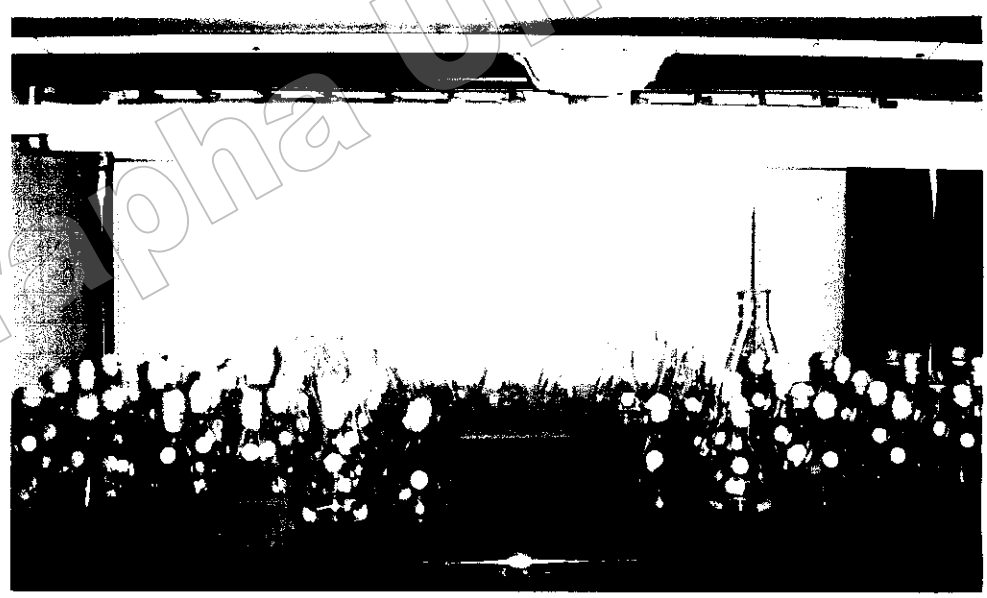
นำหัวเชื้อสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ*Ankistrodesmus* sp. ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NS III ดังที่กล่าวข้างต้นในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 1,000 ml เพื่อใช้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เป็น Stock Culture โดยทำการ Subcultures ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เลี้ยงในสภาวะดังกล่าวข้างต้น โดยมีการเติมอากาศด้วยเครื่องเติมอากาศตลอดเวลา เพื่อให้ O_2 ทำให้เซลล์ได้รับแสงอย่างทั่วถึงป้องกันมิให้สาหร่ายเกิดการตกตะกอนที่ก้น Flask

4. การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity Test)

นำสาหร่ายแต่ละชนิดที่ได้จากการเลี้ยงข้างต้นมาทำการทดลอง โดยทำการ Incubate ไว้ใน Toxicant Solutions เป็นเวลา 1-7 วัน ในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 100 ml (ดังภาพที่ 9) ตามสภาวะการทดลองข้างต้น สำหรับการทดลองนี้จะไม่เติมอากาศด้วยเครื่องเติมอากาศให้สาหร่ายแต่จะทำการเขย่าสาหร่ายวันละ 2 ครั้งด้วยมือเพื่อให้สาหร่ายได้รับแสงทั่วถึง โดยสาหร่ายจะได้รับโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ซึ่งผสมอยู่ในอาหารที่มี pH 8 นอกจากนี้ในสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบผลของโลหะหนักจะใช้ลดปริมาณ EDTA ลงเนื่องจากจะมีผลต่อความเป็นพิษของโลหะหนัก จากนั้นหลังจากได้รับโลหะหนักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และ 7 วัน จึงนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาการเจริญเติบโตด้วยวิธีต่าง ๆ และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับโลหะหนัก (Control) ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากการปนเปื้อนของโลหะหนัก เพื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเจริญเติบโตของสาหร่าย



ภาพที่ 9 ห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักต่อสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด คือ *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Ankistrodesmus* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การศึกษา Competition Growth

การเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่ายแต่ละชนิดต่อโลหะหนัก (Hg, Cd, Pb, As และ Cu) ทำโดยนำสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด *Chlorella* sp., *Ankistrodesmus* sp. และ *Scenedesmus* sp. เลี้ยงรวมกันในโลหะหนักแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในขวดรูปชมพู่ 125 ml ตามสภาวะการทดลองข้างต้น เป็นเวลา 7 วันหลังจากที่สาหร่ายได้รับโลหะหนักแล้ว นำเซลล์สาหร่ายมาทำการตรวจนับจำนวนเซลล์สาหร่ายแยกตามชนิด เพื่อดูการเจริญของสาหร่ายหลังจากได้รับโลหะหนัก (Hg, Cd, Pb, As และ Cu) เป็นการศึกษา Competition Growth ของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด

6. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Growth Measurements) ศึกษา 3 วิธีดังนี้

6.1 ทำการวัดการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด โดยการนับจำนวนเซลล์ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer) ซึ่งทำให้ทราบจำนวนของสาหร่ายที่แน่นอน (ภาคผนวก ข) นอกจากนี้ยังทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ของสาหร่ายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

6.2 ทำการวัดการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด โดยการวัดค่า OD ด้วยสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร แล้วนำค่า OD ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าการเจริญของสาหร่ายแต่ละชนิดเป็นน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ข)

6.3 การวัดปริมาณ Chlorophyll *a*

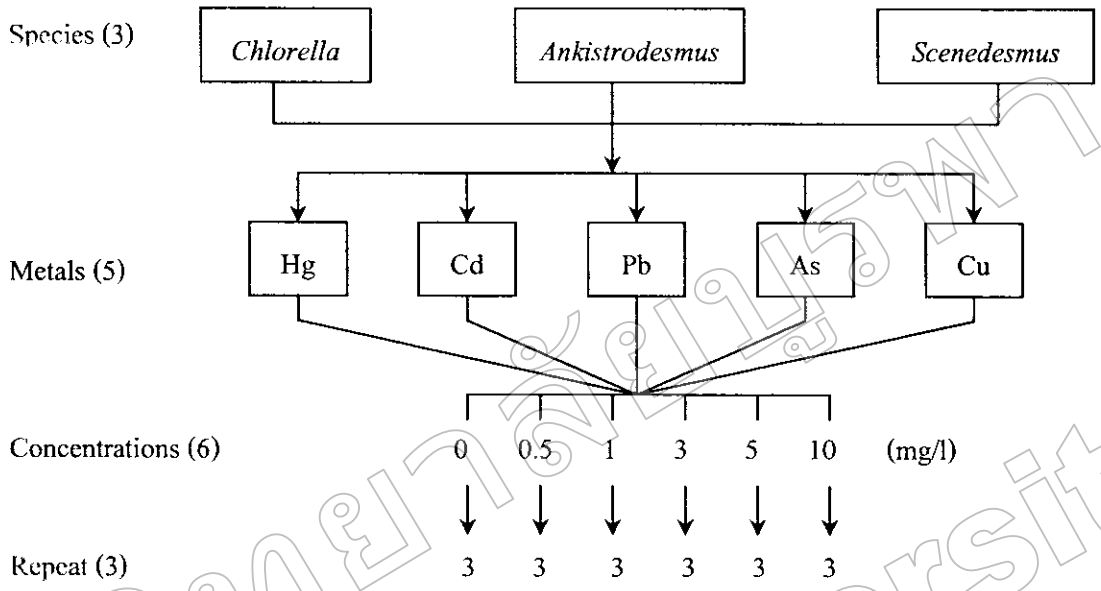
การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ ตามวิธีของ Zhu (1990) ทำโดยเก็บตัวอย่างจากแต่ละทรีตเมนต์ปริมาณ 10 ml กรองเซลล์ด้วยกระดาษกรอง GF/ C บดกระดาษกรองด้วยโกร่ง (Rinse โกร่งด้วย 80% Acetone) ปรับปริมาตรด้วย 80% Acetone (5 ml) เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm (รอบ/ นาที) นำส่วน Supernatant วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 nm และนำค่า OD ที่ได้คำนวณตามสูตรของ Jeffrey and Humphrey (1975) Chl. $a = 12.7OD_{663} - 2.69OD_{645}$ มีหน่วยเป็น mg/ l

7. วิธีการหาค่า EC_{50}

การหาค่าระดับความเข้มข้นที่มีผลให้การเจริญของสาหร่ายลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ หรือค่า EC_{50} จากการนับจำนวนเซลล์หลังจากที่สาหร่ายได้รับโลหะหนักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ไม่ได้รับโลหะหนัก (Control) นำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (%Inhibition) กับระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง (Concentrations; mg/ l) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของโลหะหนักแต่ละชนิดในสาหร่าย 3 ชนิดออกมาในรูปของสมการเส้นตรง (Linear) ดังภาคผนวก ข

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แผนการทดลอง



ภาพที่ 10 แผนการทดลองการได้รับโลหะหนักของสาหร่าย

จากภาพที่ 10 แสดงแผนการทดลองการได้รับโลหะหนักของสาหร่าย ซึ่งดำเนินการวิจัยดังที่กล่าวในข้อ 4 และ 5 แต่ในการทดลองในข้อ 5 นั้นนำสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดมาเลี้ยงรวมกันแล้วนำมาทรีตด้วยโลหะหนัก 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนับจำนวนเซลล์แยกชนิดเพื่อศึกษาผลการเจริญของสาหร่ายแต่ละชนิด

การวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยคงที่ 3 ปัจจัยคือ สาหร่าย (3 ชนิด) ชนิดโลหะหนักที่ได้รับ (5 ชนิด) และระดับความเข้มข้นที่ได้รับ (6 ระดับ) เป็นจำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้ Three-Way Fixed Factor ANOVA หาความแตกต่างรายคู่โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test, DMRT ด้วยโปรแกรม Window for SPSS Version 11.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University